

## ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ СТАН ІМУННОЇ СИСТЕМИ ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ В ДИНАМІЦІ ПРОТИПУХЛИННОГО ЛІКУВАННЯ

*Г. Д. Бендюг, Ю. Я. Гриневич, О. І. Смикодуб, Н. М. Храновська, І. Ю. Глуховська, В. С. Іванкова, Л. В. Радзієвська, Н. В. Снігирь.*  
Український НДІ онкології та радіології

Розвиток неопластичних процесів і основні методи їх лікування (променевої і хіміотерапевтичної) справляють виражену депресивну дію на кровотворну та імунну системи організму. Погіршення стану імунної системи та мієлотоксичний ефект цитостатичних препаратів у багатьох випадках лімітують проведення сучасної повнодозної хіміотерапії,

---

© Г. Д. Бендюг, Ю. Я. Гриневич, О. І. Смикодуб, Н. М. Храновська, І. Ю. Глуховська, В. С. Іванкова, Л. В. Радзієвська, Н. В. Снігирь, 1998

що призводить до неповноцінного лікування і передчасної смерті значної частини хворих. Ефективним методом профілактики і лікування цих ускладнень є трансплантація мієлоїдної тканини. Крім кісткового мозку, джерелом стовбурих кровотворних клітин може слугувати печінка ембріону, взята на певному етапі його розвитку.

В літературі є багато доказів, що свідчать про здатність гемопоетичних клітин ембріональної печінки (КЕП) відновлювати гемопоез та імунологічну компетентність у летально опромінених сингенних та алогенних тварин, у тварин зі спадковим сильним комбінованим імунодефіцитом; у хворих апластичною анемією, важкою комбінованою імунологічною недостатністю, при аплазіях кровотворення внаслідок хімотерапії у хворих солідними пухлинами і гемобластозами [1; 2; 3]. Є повідомлення про можливість гальмування розвитку метастазів експериментальних пухлин у легенях [4] трансплантацією гемопоетичних клітин, про перші результати такого ефекту у хворих остеогенною саркомою [5]. Отримано докази функціонування КЕП в організмі реципієнта з розвитком стабільного химеризму; при цьому в жодному випадку не реєструвалося будь-яких ознак реакції «трансплантат проти господаря» [6].

Поодинокі дані літератури про вплив КЕП на імунну систему хворих солідними пухлинами недостатньо висвітлюють цю проблему, тому питання придатності клітин печінки для лікування депресій гемопоезу та імуногенезу у цієї категорії хворих залишається відкритим.

Нами проведено трансплантацію алогенних КЕП 25 хворим з депресією кровотворення та імуногенезу, що перешкоджає проведенню лікування в запланованому режимі. Серед них 16 дітей віком від 2 до 15 років (13 хворих з остеогенною і хондросаркомою, 3 — з пухлиною Вільмса, III–IV стадія) та 9 жінок 21–70 років, хворих на рак шийки матки, II–III стадія. Трансплантаційний матеріал отримували з центру ембріональних тканин «Emcell». Для трансплантації використовували клітини печінки ембріону 7–12 тижнів гестації (саме на цьому терміні розвитку в печінці міститься найбільша кількість стовбурих кровотворних клітин, а поодинокі лімфоїдні клітини функціонально неповноцінні, що унеможлиблює розвиток реакції «трансплантат проти господаря»). Об'єм введеної клітинної суміші — 2–4 мл з кількістю клітин  $(0,1-4,0) \times 10^8$  і вмістом КУОГМ  $(0,6-1,5) \times 10^5$  в даному об'ємі.

Оцінку ефективності трансфузії досліджували за впливом на гематологічні (кількість лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів

і гемоглобіну) та імунологічні (загальна кількість лімфоцитів та їх субпопуляцій: лімфоцити з фенотипом CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, співвідношення CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) показники. Імунофенотипування лімфоцитів проводили за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) фірми «Сорбент» (Росія). Досліджували ендокринну функцію тимусу за титром тимічного сироваткового фактора (ТСФ) та стан природної резистентності – за кількістю великих гранулярних лімфоцитів (ВГЛ) у периферійній крові. Дослідження проводили до і на 1–30-й і більше день після трансплантації КЕП.

Аналіз середніх значень гематологічних досліджень після трансплантації КЕП показав, що кількісні показники червоної та білої крові в різні терміни спостереження у дітей залишалися на передтрансплантаційному рівні, а у жінок мали тенденцію до збільшення, незважаючи на продовження лікування. Так, у жінок з раком шийки матки достовірно зростання кількості лейкоцитів спостерігається через 2–3 тижні після трансплантації КЕП і становить  $(3,76 \pm 0,31) \times 10^9/\text{л}$  порівняно з  $(2,40 \pm 0,19) \times 10^9/\text{л}$  до трансплантації ( $P < 0,05$ ). В групі хворих дітей з остеогенною саркомою спостерігався найменший ефект внаслідок постійного впливу «агресивних» схем хіміотерапії, які часто повторюються.

Індивідуальний аналіз матеріалу надає змогу продемонструвати позитивний вплив трансплантації КЕП на гемопоез деяких хворих із дуже низьким вихідним рівнем гематологічних показників. Зважаючи на динаміку цих показників, у хворих констатується раннє приживлення і функціонування трансплантанта. Наприклад, у хворої К. (історія хвороби № 96 за 1996 р.) з остеосаркомою протягом всього періоду спостереження відбувалося поступове наростання кількості клітин всіх наростків кровотворення (табл. 1). Аналогічна тенденція характерна і для хворих з пухлиною Вільмса.

Таблиця 1. Динаміка гематологічних показників у хворої К. з остеогенною саркомою в різні терміни після трансплантації КЕП

Термін обстеження	Еритроцити, $\times 10^{12}/\text{л}$	Hb, г/л	Тромбоцити, $\times 10^9/\text{л}$	Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	Нейтрофіли	
					%	$\times 10^9/\text{л}$
До трансплантації	2,9	80	0,88	1,2	59	0,71
Після трансплантації						
1–3-й день	3,2	92	0,82	1,8	29	0,52
5–8-й день	2,9	81	1,47	2,4	47	1,13
14–21-й день	3,4	112	1,87	2,0	33	0,66
1 місяць і більше	3,5	103	2,3	2,4	32,5	0,78

В процесі дослідження показників клітинного імунітету у хворих з депресією гемопоезу після хіміо- і променевої терапії відмічено значне їх пригнічення (табл. 2). Так, після 2-го курсу протипухлинного лікування спостерігається достовірно зниження абсолютної кількості CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів у хворих обох груп (жінок і дітей) порівняно з групою практично здорових людей. У дітей, до того ж, менше співвідношення CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, що характерно при остеогенній саркомі. У жінок стимулюючий вплив трансплантанта на імунну систему реєстрували за тенденцією до збільшення всіх показників, які досліджували через 14 діб після трансфузії, що утворювався за рахунок загального збільшення числа лейкоцитів.

У дітей трансплантант справляв виражену активуючу дію на клітинний імунітет реципієнта. На 7-му добу після трансплантації збільшилася відносна та абсолютна кількість CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, абсолютна кількість CD8<sup>+</sup> (достовірними були зміни у випадку CD4<sup>+</sup>, їх абсолютна кількість зросла майже у 3,5 раза). Співвідношення CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> підвищилось, хоч і не досягло нормального рівня. Розвиток імунної реакції супроводжувався на 20-й день порушенням у співвідношенні CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> в бік зменшення відносної і абсолютної кількості CD4<sup>+</sup> і збільшення CD8<sup>+</sup> до рівня практично здорових людей, що можна пояснити активністю CD8<sup>+</sup>, які пригнічують утворення Т-хелперів і таким чином протистоять клітинній імунній відповіді реципієнта на алогенний трансплантант [7]. Кількість CD22<sup>+</sup>, при цьому, збільшилась до передтрансплантаційного рівня (див. табл. 2). Збільшення загальної кількості лімфоцитів за 3 тижні після трансплантації відбувалося, в основному, за рахунок CD8<sup>+</sup> та лімфоцитів, що не належать ні до CD3<sup>+</sup>, ні до CD22<sup>+</sup>, так званих нульових лімфоцитів.

ВГЛ – унікальна популяція лімфоцитів, яка включає фактично всі NK-клітини та клітини, що володіють анти-тілозалежною клітинною цитотоксичністю. У хворих досліджуваних груп внаслідок хіміо- і променевої терапії кількість ВГЛ у периферійній крові суттєво знижена і становить у дітей з остеогенною саркомою  $(0,016 \pm 0,07) \times 10^9/\text{л}$  та пухлиною Вільмса  $(0,074 \pm 0,056) \times 10^9/\text{л}$  проти  $(0,270 \pm 0,020) \times 10^9/\text{л}$  у здорових дітей ( $P < 0,05$ ). Трансплантація КЕП сприяє підвищенню рівня цих клітин: вже за 5–8 діб рівень ВГЛ зростає у 1,5 раза і продовжує поступово наростати в подальші терміни спостереження. Через місяць і більше після трансплантації реєструється 3-разове (у хворих з остеосаркомою) і 5-разове (у хворих з пухлиною Вільмса) зростання рівня ВГЛ у периферійній крові порівняно з вихідними показниками ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 2. Вплив трансплантації КЕП на вміст лімфоцитів та їх субпопуляцій у онкологічних хворих в динаміці лікування

Термін обстеження	Лімфоцити, $\times 10^9/\text{л}$		CD3+		CD4+		CD8+		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>		CD22 <sup>+</sup>	
	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$
До трансплан-тації	0,52±0,13	59,40±14,45	0,28±0,01*	34,01±7,40	0,16±0,00*	29,61±2,80	0,15±0,03*	1,13±0,23	10,43±7,69	0,07±0,05		
Після транс-план-тації	1,31±0,41	77,57±4,95	1,05±0,39	41,3±2,1	0,54±0,16**	27,80±1,84	0,36±0,12	1,49±0,03	3,03±2,10	0,03±0,01		
7-й день	1,44±0,56	59,85±9,30	0,89±0,47	13,25±7,07	0,16±0,02	36,9±12,50	0,57±0,38	0,43±0,33	7,30±6,14	0,08±0,04		
19-20-й день	0,92±0,01	60,03±2,24	0,55±0,03*	38,70±1,80	0,36±0,02*	21,06±1,37	0,19±0,02*	1,80±0,00	12,7±3,14	0,12±0,03		
Після транс-план-тації	1,14±0,38	59,03±1,54	0,67±0,2	35,80±1,73	0,40±0,11	19,40±2,21	0,22±0,04	1,80±0,12	14,25±0,56	0,17±0,05		
Після транс-план-тації (14-й день)	1,71±0,58	60,94±1,49	1,34±0,02	38,55±0,84	0,86±0,01	23,89±2,01	0,52±0,01	1,63±0,04	8,84±1,44	0,21±0,08		

*Діти з остеогенною саркомою*

*Жінки з раком шийки матки*

*Практично здорові*

\*Різниця середніх величин в групах здорових і хворих людей статистично достовірна ( $P < 0,05$ );  
 \*\*Різниця середніх величин в групах до і після трансплантації статистично достовірна ( $P < 0,05$ ).

Перебіг пухлинного процесу супроводжується порушеннями в лімфоїдному і епітеліальному елементах тимусу, що виявляється у зниженні його ендокринної функції. Дослідження свідчать про достовірне зниження титру ТСФ у сироватці крові хворих на остеосаркому і пухлину Вільмса. Вже через 14–20 діб після трансплантації титр ТСФ у дітей з остеогенною саркомою майже не відрізнявся від титру у практично здорових дітей, але через місяць знижувався; у дітей з пухлиною Вільмса підвищення титру ТСФ було більш тривалим (табл. 3). Така ж закономірність спостерігається і у хворих на рак шийки матки.

Таблиця 3. Показники трансплантації КЕП у хворих злоякісними новоутвореннями різних груп

Момент обстеження	Група		
	остеогенна саркома, n = 13	пухлина Вільмса, n = 3	рак шийки матки, n = 9
До трансплантації	3,50±0,35*	3,50±0,65*	3,10±0,45
Після трансплантації			
1–3-я доба	4,66±0,48*	–	–
5–8-а доба	4,37±0,49*	4,50±1,87	4,30±1,36
14–20-а доба	5,00±0,62**	–	5,20±0,52**
через 1 місяць і більше	3,90±0,53*	5,00±2,50	3,0±2,5
Практично здорові:			
діти	6,14±0,08		
жінки	3,65±0,10		

\* Різниця середніх величин в групах здорових і хворих дітей статистично достовірна ( $P < 0,05$ );

\*\* Різниця середніх величин в групах до і після трансплантації статистично достовірна ( $P < 0,05$ )

За даними деяких авторів [8], при трансплантації КЕП не спостерігається змін функціональної активності тимусу реципієнта, незважаючи на факт встановлення химеризму. Ми у хворих досліджуваних груп зареєстрували посилення ендокринної функції тимусу вже через 1–3 доби після трансплантації, з поступовим наростанням титру ТСФ в циркуляції протягом місяця, але цей факт не досить тривалий.

Таким чином, результати дослідження дозволяють зробити висновок про можливість клітин печінки ембріону гальмувати прогресуючу цитопенію в динаміці лікування онкологічних хворих. Їх введення сприяє підтриманню гематологічних показників на вихідному рівні, що дає змогу не переривати

лікування і призначати подальші курси хіміотерапії в потрібному режимі. Трансплантація КЕП активує імунну систему та систему природної резистентності хворих, що супроводжується поліпшенням їх загального стану. Ефективний вплив гемопоетичних клітин печінки на досліджувані показники свідчить про можливість використання цього методу терапії для профілактики та лікування депресій гемопоезу та імуногенезу у хворих солідними пухлинами, які виникають під впливом променевої або хіміотерапії.

1. *Алексеева И. Н., Брызгина Т. М., Павлович С. И.* Печень и иммунологическая реактивность. — Киев: Наук. думка, 1991. — 167 с.

2. *Любимова Л. С., Гласко Е. И.* Особенности восстановления гемопоэза после алло- и аутомиелотрансплантации у больных гемобластозами // Гематол. и трансфузиол. — 1995. — № 4. — С. 25–32.

3. *Tomas D. B.* The infusion of human fetal liver cells // Stem Cells. — 1993. — 11. — suppl 1. — P. 66–71.

4. *Дейчман Г. И., Кашкина Л. М.* Влияние клеток костного мозга, селезенки и перитонеального экссудата на метастазирование опухолевых клеток в легкие сирийских хомячков // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1982. — № 10. — С. 102–105.

5. *Есартия Е. Т., Дейчман Г. И.* Подавление развития легочных метастазов у радикально оперированных больных остеогенной саркомой с помощью однократной трансфузии нормального аллогенного костного мозга // Вестник ОНЦ АМН России. — 1993. — № 3. — С. 53–56.

6. *Грищенко В. И., Лобынцева Г. С.* Гемопоэтические клетки эмбриональной печени. — Киев: Наук. думка, 1988. — 190 с.

7. *Алексеев Л. П.* Иммунологический контроль (мониторинг) в клинике аллотрансплантации почки // Иммунология. — 1984. — № 6. — С. 26–32.

8. *Pahwa R., Pahwa S.* Treatment of the immunodeficiency disease progress toward replacement therapy emphasizing cellular and macromolecular engineering // Springer. — 1978. — Vol. 1. — P. 487.